



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO DE ÓLEOS DE ORIGEM VEGETAL NA INIBIÇÃO DE
BACTÉRIAS CARIOGÉNICAS – ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por
Patrícia Lucas Pratas
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO DE ÓLEOS DE ORIGEM VEGETAL NA INIBIÇÃO DE
BACTÉRIAS CARIOGÉNICAS – ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por
Patrícia Lucas Pratas
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Manso

e coorientado por
Prof. Doutora Helena Barroso

outubro de 2018

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ana Cristina Manso, por ter aceite orientar este trabalho. Por todo o empenho, entusiasmo e inspiração que é para mim. Obrigada pelo desafio e por acreditar no meu trabalho.

À Professora Doutora Helena Barroso, pela imprescindível dedicação e colaboração na parte laboratorial. Grata pela disponibilidade e todo o apoio que sempre demonstrou.

Ao Instituto, pelo acesso ao Laboratório de Microbiologia e por me facultar todos os materiais, sem os quais não seria possível realizar este projeto de investigação.

Aos meus companheiros de todas as horas, Filipa Raquel e João Barreto, por me acompanharem nestes cinco anos e por me terem ensinado o verdadeiro significado da amizade. A vocês, agradece-vos do fundo do coração!

Às minhas queridas, Carlota Barros e Margarida Teixeira, pelo companheirismo e tardes de quinta-feira produtivas. Obrigada por terem sido uma alegre surpresa para mim, espero levar-vos para a vida!

Ao meu parceiro de box, Gonçalo Santos, por me ter acompanhado desde o primeiro dia e por formarmos uma equipa extraordinária. Obrigada por todos os momentos que partilhámos!

A todos os que marcaram o meu percurso académico, a vocês, um grande obrigado por de alguma forma terem feito deste percurso uma experiência inesquecível.

Ao meu pai, por ser um conselheiro excecional tanto nos bons como nos maus momentos. Obrigada por todos os ensinamentos e todo o teu amor!

E por fim, à minha mãe, por ser um apoio incondicional e o melhor exemplo a seguir e por me ensinar que, apesar dos obstáculos que a vida nos coloca, conseguimos dar sempre a volta por cima.

Aos meus pais, a minha inspiração sempre.

Muito obrigada por tudo.

RESUMO

Objetivos: Os colutórios antimicrobianos atuam como adjuvantes dos cuidados diários e impedem de modo eficaz a colonização de microrganismos. Este estudo tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, do óleo de coco e do óleo de sésamo sobre bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, e ainda *Streptococcus mitis*.

Materiais e Métodos: Foi realizado um estudo observacional onde os ensaios foram efetuados de acordo com os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), pelo método de difusão em disco e pelo método de diluição em meio líquido. No método de difusão em disco, os microrganismos foram inoculados em meio de cultura (Mueller-Hinton com sangue para *Streptococcus* e Rogosa agar para *Lactobacillus*), aplicando-se de seguida o óleo de coco e o óleo de sésamo sobre discos estéreis. Após 24h e 48h, foi avaliada a ausência ou não de crescimento bacteriano. No método de diluição, a suspensão bacteriana foi adicionada ao óleo, em volumes iguais, e foi observada a ausência ou presença de crescimento, tendo sido utilizadas suspensões bacterianas com concentrações entre 10^8 ufc/ml e 10^1 ufc/ml. Foi empregue uma análise qualitativa para observar a presença ou ausência de crescimento microbiano.

Resultados: Nenhum dos óleos testados apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Este resultado foi consistente independentemente do método utilizado.

Conclusões: Através dos ensaios *in vitro* efetuados, foi possível verificar que o óleo de coco e o óleo de sésamo não apresentam atividade antimicrobiana direta contra bactérias cariogênicas. Alguns autores defendem a capacidade antimicrobiana do óleo de coco devido ao efeito de saponificação, emulsão e ação de limpeza mecânica. No entanto todos estes efeitos são indiretos. Com este estudo demonstrámos que a ação antimicrobiana direta não se verifica.

Palavras-chave: *oil pulling*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, *Streptococcus mitis*, óleo de coco, óleo de sésamo, clorohexidina

ABSTRACT

Objectives: Antimicrobial mouthwashes act as adjuncts to daily care and effectively prevent the colonization of microorganisms. This study aims to evaluate the in vitro antimicrobial activity of coconut oil and sesame oil on cariogenic bacteria such as *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp* and *Streptococcus mitis*.

Materials and Methods: An observational study was conducted in which the assays were performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria, by the disk diffusion method, by the liquid dilution method and by the microdilution method. In the disc diffusion method, the microorganisms were inoculated in culture medium (Mueller-Hinton with blood for *Streptococcus* and Rogosa agar for *Lactobacillus*), then the coconut oil and sesame oil were applied on sterile disks. After 24h and 48h the absence or presence of bacterial growth was evaluated. In the dilution method, the bacterial suspension was added to the oil in equal volumes, and the absence or presence of growth was observed, and bacterial suspensions were used with concentrations between 10^8 cfu/ml and 10^1 cfu/ml. A qualitative analysis was employed to observe the presence or absence of microbial growth.

Results: None of the oils tested showed antimicrobial activity against the tested microorganisms. This result was consistent regardless of the method used.

Conclusions: The in vitro tests carried out showed that coconut oil and sesame oil do not present direct antimicrobial activity against cariogenic bacteria. Some authors defend the antimicrobial capacity of coconut oil due to the effect of saponification, emulsion and mechanical cleaning action. However, all these effects are indirect. With this study we demonstrated that the direct antimicrobial action does not occur.

Keywords: oil pulling, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, *Streptococcus mitis*, coconut oil, sesame oil, chlorhexidine

Índice Geral

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	11
I. INTRODUÇÃO	13
I.1 BIOFILME ORAL.....	14
I.1.1 Conceito	14
I.1.2 Biofilme cariogénico.....	15
I.2 CÁRIE DENTÁRIA	16
I.2.1 Definição	16
I.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	16
I.3.1 Triclosan.....	18
I.3.2 Xilitol.....	18
I.3.3 Flúor.....	19
I.3.4 Clorohexidina	19
I.4 ÓLEOS VEGETAIS	22
I.4.1 Óleo de sésamo	22
I.4.2 Óleo de coco.....	22
I.4.3 <i>Oil pulling</i>	25
I.5 PERTINÊNCIA DO ESTUDO	29
I.6 OBJECTIVOS DE ESTUDO	29
I.7 HIPÓTESES DE ESTUDO.....	29
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
II.1 Local de estudo	31
II.2 Tipo de estudo.....	31
II.3 Seleção dos óleos	31
II.4 Grupos de controlo	32

II.5	Metodologia	32
II.5.1	PREPARAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS	32
II.5.2	MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR	33
II.5.3	MÉTODO DE DILUIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO	34
III.	RESULTADOS	37
III.1	MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO	37
III.2	MÉTODO DE DILUIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO	39
IV.	DISCUSSÃO	43
IV.1	Método de difusão em disco	43
IV.2	Método de diluição em meio líquido.....	46
IV.3	Considerações finais.....	47
IV.4	Limitações do estudo.....	48
IV.5	Perspetivas futuras.....	48
V.	CONCLUSÕES	49
VI.	BIBLIOGRAFIA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema clássico de Newbrun	16
Figura 2 - Composição geral do coco (Adaptado de DebMandal & Mandal, 2011).....	23
Figura 3 - Reação de saponificação (Adaptado de Peedikayil et. al., 2015).....	28
Figura 4 - Óleos de coco selecionados.....	31
Figura 5 - Óleos de sésamo selecionados.....	31
Figura 6 - Clorohexidina 0,12% (LACER® colutório 200 ml).....	32
Figura 7 - Monofluorofosfato de sódio 0,05% + Xilitol 3,33% (VITIS® Anticaries colutório 500 ml, lote K1006)	32
Figura 8 - Clorohexidina 0,2%, diluição de digluconato de clorohexidina (SIGMA® solução 100 ml, lote BCBM3595V)	32
Figura 9 - <i>S. mutans</i> ATCC 25176, <i>S. mitis</i> ATCC 6249 e <i>L. plantarum</i> CIP A159, cedido pelo laboratório de Microbiologia	33
Figura 10 - Esquema do método de difusão em disco	33
Figura 11 - Colocação das placas para <i>Streptococcus</i> em caixa com gerador de anaerobiose	34
Figura 12 - Esquema do método de diluição em meio líquido (esquema não está à escala).....	35
Figura 13 - Suspensões bacterianas com conteúdos aproximados de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 ufc/ml de <i>S. mutans</i>	36
Figura 14 - Esquema do método de diluição em meio líquido com conteúdos microbianos mais baixos - concentrações decrescentes (esquema não está à escala)	36
Figura 15 - Resultados obtidos pelo método de difusão em disco para <i>S. mutans</i> , utilizando o óleo de sésamo.....	38
Figura 16 - Resultados obtidos pelo método de difusão em disco para <i>S. mitis</i> , utilizando o óleo de coco.....	38
Figura 17 - (1) Resultados do método de diluição para <i>S. mutans</i> para AC (2) Resultados do método de diluição para <i>S. mutans</i> para AS	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de agentes antimicrobianos utilizados em colutórios e pastas dentífricas (Adaptado de Sala & García, 2013).....	17
Tabela 2 - Formas de apresentação da CHX (Adaptada de Sala & García, 2013)	21
Tabela 3 - Composição do óleo de coco em ácidos gordos (Adaptada de Peedikayi et. al., 2016)	23
Tabela 4 - Resultados do método de difusão em disco	37
Tabela 5 - Resultados do método de diluição para <i>S. mutans</i> e <i>S. mitis</i>	39
Tabela 6 - Resultados do método de diluição para <i>L. plantarum</i>	40
Tabela 7 - Resultados do método de diluição para <i>S. mutans</i> para conteúdos bacterianos de 10^8 a 10^1 ufc/ml.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µl – microlitros

AC – amostra A de óleo de coco

ADE – água destilada estéril

AS – amostra A de óleo de sésamo

BC – amostra B de óleo de coco

BS – amostra B de óleo de sésamo

CAM – medicina complementar e alternativa

CC – amostra C de óleo de coco

CHX - clorhexidina

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CS – amostra C de óleo de sésamo

F⁻ - íão fluoreto

h – horas

H⁺ - íão hidrogénio

MAS – mitis salivaris agar

McF – Macfarland

MFP – monofluorofosfato

ml – mililitros

mm – milímetros

NaF – fluoreto de sódio

ppm – partes por milhão

RA – rogosa agar

ufc – unidades formadoras de colónias

ufc/ml – unidades formadoras de colónias por mililitro

% - percentagem

® - marca registada

°C – graus celsius

I. INTRODUÇÃO

Uma boa higiene oral é um componente integral de uma boa saúde geral. E, independentemente de as técnicas dentárias se terem sofisticado, a medicina dentária preventiva continua a ser a base sobre a qual os cuidados da saúde oral devem ser construídos, tendo sido, por isso, desenvolvidos agentes quimioterapêuticos de uso doméstico (Jauhari, Srivastava, Rana, & Chandna, 2015).

Os colutórios antimicrobianos atuam como adjuvantes dos cuidados diários e impedem de modo eficaz a colonização de microrganismos. No entanto, o aumento da prevalência dos efeitos colaterais de muitos medicamentos sintéticos tem encorajado os cientistas a pesquisar alternativas complementares (Jauhari et al., 2015).

O óleo de coco, por exemplo, é um produto comum, que tem efeito antimicrobiano numa vasta gama de microrganismos encontrados no corpo humano (Singla, Acharya, Martena, & Singla, 2014). E, devido à sua elevada concentração em ácidos gordos de cadeia média, dos quais 45 a 50 por cento é ácido láurico, provou ter efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos (Kumar & Shanbhag, 2017; Peedikayi et al., 2016).

Asokan e colaboradores (2009) observaram, no seu estudo *in vitro*, que os benefícios do bochecho com um óleo, semelhante ao de coco, na saúde oral, se deviam ao efeito de saponificação, emulsão e ação de limpeza mecânica.

E, de um modo geral, o bochecho com o óleo não provoca efeitos adversos (Peedikayi et al., 2016) nem possui desvantagens exceto a duração prolongada do procedimento, quando comparado à clorhexidina (Pathak, 2016), por exemplo, que a longo prazo altera o gosto e pigmenta os dentes (Lorenz et al., 2006).

A literatura é limitada e, por isso, torna-se útil que existam mais estudos com o objetivo de se estabelecer a eficácia desta abordagem, de modo a compreender o efeito de óleos vegetais sobre a saúde oral.

I.1 BIOFILME ORAL

A cavidade oral é o ambiente ideal para o desenvolvimento de microrganismos pois apresenta tanto superfícies húmidas com nutrientes abundantes como a temperatura ideal, entre outros fatores. E, através destas condições, os microrganismos subsistem maioritariamente sob a forma de **biofilmes**, resultando num ecossistema complexo e equilibrado (Singh, Sharma, & Shreehari, 2015).

I.1.1 Conceito

O termo biofilme é definido como uma comunidade homogénea ou heterogénea séssil de bactérias, constituída por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato ou umas às outras, e que estão incorporadas numa matriz de polímeros extracelulares. Esta matriz é principalmente formada por polissacarídeos, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee, & Tribedi, 2016; Singh et al., 2015; Szafranski, Winkel, & Stiesch, 2017; Valen & Scheie, 2018).

Os biofilmes podem ser encontrados em superfícies bióticas ou em superfícies abióticas, como os implantes dentários, e desenvolvem-se como um ciclo, através de várias fases tais como adesão reversível, adesão irreversível, maturação e dispersão (Gupta et al., 2016).

Além disso, os microrganismos presentes no biofilme podem ser até mil vezes mais resistentes que bactérias planctónicas a terapias convencionais com agentes antibacterianos como antibióticos ou clorohexidina (Karygianni, Al-ahmad, Argyropoulou, & Hellwig, 2016).

O biofilme que se forma sobre as superfícies dentárias é conhecido como placa dentária e é o mais abundante na cavidade oral. Na superfície lingual e mucosas, ainda que se forme também, é rapidamente eliminado de forma natural pelo processo de descamação (Sala & García, 2013).

I.1.2 Biofilme cariogénico

O biofilme cariogénico é constituído por *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces*, *Streptococcus não mutans* e leveduras (Asokan et al., 2008; Sharath Asokan, Emmadi, & Chamundeswari, 2009).

No entanto, existem dois microrganismos que são os principais responsáveis pela cárie: *S. mutans* e *Lactobacillus* (Lakshmi, Rajendran, & Krishnan, 2013; Puri, 2015), sendo que *S. mutans* tem sido considerado como um dos organismos mais virulentos (Jauhari et al., 2015; Kaushik et al., 2016; Sala & García, 2013).

S. mutans é considerado o principal responsável pelo início da cárie dentária e que facilmente também conduz à sua progressão. Apresenta uma capacidade de adesão às estruturas da cavidade oral, devido à produção de glicosiltransferases; produz de forma exacerbada ácidos, característica exclusiva da sua espécie no género *Staphylococcus*, e é capaz de sobreviver nesse tipo de meio (potencial acidúrico) pois contém uma enzima, ATPase, que transporta substâncias ácidas para fora da sua célula. Ainda utiliza polissacarídeos intra e extracelulares para produção de energia e garantir a firmeza gelatinosa do biofilme, facilitando a acumulação de restos alimentares e de outros microrganismos (Cardoso, Passos, & Raimondi, 2018). *Lactobacillus spp.* é um conjunto de organismos que desempenham o papel principal na progressão da lesão de cárie (Leites, Pinto, & Sousa, 2006).

Estas duas espécies convertem os hidratos de carbono fermentáveis da dieta em ácido láctico, o que reduz o pH do ambiente envolvente e solubiliza o fosfato de cálcio do esmalte. Além disso, as condições de baixo pH geradas alteram o equilíbrio da microflora da placa e favorecem, por exemplo, a proliferação de *Candida spp.* (Singla et al., 2014; Thaweboon, Nakaparksin, & Thaweboon, 2013).

Assim sendo, apesar deste biofilme ser invisível e aparentar ser inofensivo, como foi referido, é responsável pela desmineralização da superfície dentária e, portanto, pela formação de lesões de **cárie dentária** (Sala & García, 2013), sendo, por esse motivo, importante aplicar medidas apropriadas para a prevenção destas patologias (S. Singh et al., 2015; Valen & Scheie, 2018).

I.2 CÁRIE DENTÁRIA

I.2.1 Definição

A cárie dentária é a doença de etiologia multifatorial que, segundo o esquema de Newbrun (Figura 1), resulta da interação da suscetibilidade do hospedeiro, do substrato disponível, do microbioma cariogénico e do tempo (Sala & García, 2013), entre outros fatores. O seu processo está diretamente ligado à capacidade desses microrganismos colonizarem a superfície dentária e formarem a placa (Asokan, Rathan, Muthu, Rathna, & Emmadi, 2008; Peedikayi et al., 2016; Kaushik et al., 2016).

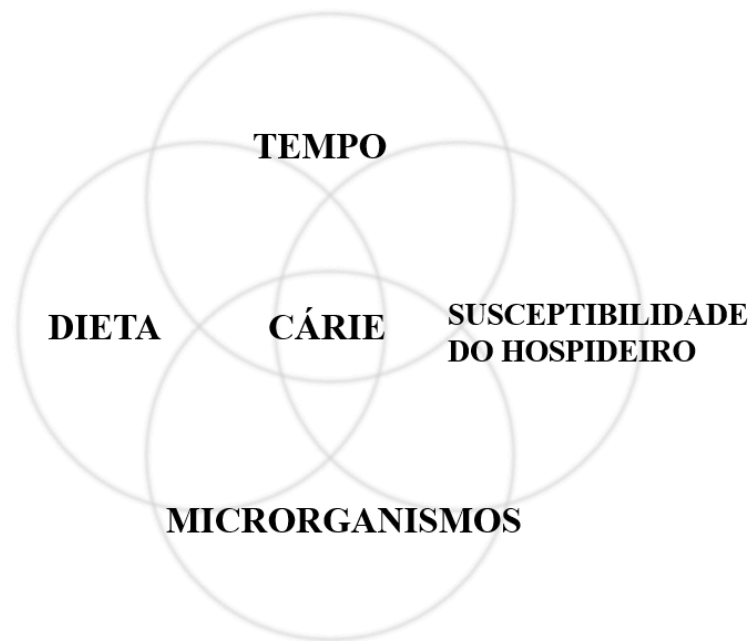


Figura 1 - Esquema clássico de Newbrun

A cárie dentária é das patologias mais prevalentes em todo o mundo (Sala & García, 2013) e é a principal causa de perda de dentes em crianças (Anand, Pothiraj, Gopinath, & Kayalvizhi, 2008).

Os métodos fundamentais usados para a sua deteção consistem em realizar um diagnóstico visual e táctil (Sala & García, 2013).

I.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Ainda que o controlo mecânico seja a forma mais comum de eliminar a placa, o uso adicional de antimicrobianos pode ser benéfico e, em certos casos, fundamental. São frequentes as pessoas que têm insuficiente destreza manual, pouca motivação ou até

cooperação. É, por isso, necessário em determinadas situações clínicas, a utilização destes agentes (Sala & García, 2013), alguns descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos de agentes antimicrobianos utilizados em colutórios e pastas dentífricas (Adaptado de Sala & García, 2013)

AGENTES CATIÓNICOS	Clorohexidina
	Hexitidina/ Cloreto de cetilpiridínio
SAIS METÁLICOS	Citrato de zinco
	Fluoreto de estanho
AGENTES OXIGENANTES	H ₂ O ₂
ÓLEOS ESSENCIAIS E DERIVADOS	Triclosan
ALCOÓIS	Xilitol
EXTRATOS À BASE DE PLANTAS	Variável

Estes agentes químicos podem atuar em várias etapas da formação ou maturação do biofilme, através dos seguintes mecanismos: inibição da adesão e colonização microbiana; inibição do crescimento e metabolismo microbiano; rutura de biofilmes maduros e modificação da bioquímica ecológica do biofilme (Fejerskov & Kidd, 2008).

Na cavidade oral, os agentes antimicrobianos podem ser administrados por meio de diferentes formulações tais como sprays, pastas dentífricas, géis, pastilhas, dispositivos de libertação prolongada (vernizes) e colutórios (Fejerskov & Kidd, 2008), sendo que os mais comuns são as pastas e os colutórios (Sala & García, 2013; Gunsolley, 2006).

Gunsolley (2006) conduziu uma revisão sistemática da literatura de modo a avaliar a eficácia destes produtos, em ensaios de seis meses, concluindo que existe uma forte evidência e que grande parte dos estudos apoiam a eficácia dos agentes antimicrobianos.

I.3.1 Triclosan

O triclosan é um dos agentes que é utilizado para o controlo da placa e redução da gengivite em forma de colutórios e pastas dentífricas, usualmente associado a copolímeros (Sala & García, 2013; Fejerskov & Kidd, 2008).

É um derivado fenólico não-iónico de baixa toxicidade, com um amplo espectro de ação, demonstrado em estudos *in vitro* (Roopavathi et al., 2015; Rossi et al., 2014) que inclui bactérias Gram positivo e Gram negativo, micobactérias, esporos, bactérias anaeróbias e *Candida* (Sala & García, 2013; Fejerskov & Kidd, 2008), apresentando também propriedades anti-inflamatórias.

Em produtos comerciais, o triclosan é solubilizado geralmente em mais do que um detergente, como o lauril sarcosinato de sódio, o dodecilsulfato de sódio, o polietileno glicol e o propileno glicol (Fejerskov & Kidd, 2008). Como possui baixa substantividade, é formulado associado a diversos componentes, de modo a aumentar a sua ação residual e diminuir a sua taxa de libertação. Já foi estudada a sua associação (0,3%) com um copolímero (2% de polivinilmetilo éter de ácido maleico) e com fluoreto de sódio (0,243%) numa base de sílica (Sala & García, 2013). A outra alternativa para potencializar a sua ação antimicrobiana é adicionando citrato de zinco (Fejerskov & Kidd, 2008).

Anushree e colaboradores (2015) estudaram diferentes pastas dentífricas e mostraram que a atividade antimicrobiana do triclosan e flúor (1000 ppm) como ingredientes principais apresentaram uma atividade superior, com diferença significativa ($p < 0,05$) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (Anushree, Fawaz, Narahari, Shahela, & Syed, 2015).

Porém, segundo uma revisão sistemática publicada no jornal da American Dental Association, concluiu-se que existe pouca evidência que prove o efeito individual do triclosan (Pickett FA, 2011) e existe um estudo que se debruçou sobre o risco carcinogénico do mesmo (Dinwiddie, Terry, & Chen, 2014).

I.3.2 Xilitol

O xilitol é um álcool de cinco átomos de carbono, usado como substituto do açúcar (Fejerskov & Kidd, 2008) e geralmente usado na formulação das pastilhas elásticas ou pastas dentárias. Tem um efeito anticariogénico passivo, comum com outros álcoois, porque resiste à fermentação dos microrganismos para a formação de ácidos

(Mickenausch & Yengopal, 2012) e ativo, porque reduz a placa bacteriana e inibe o crescimento e metabolismo de *Streptococcus* do grupo *mutans* (Söderling, 2009; Sala & García, 2013).

Três estudos recentes, com duração de seis meses, demonstraram uma diminuição na contagem de *S. mutans* associada a xilitol na placa (Haresaku et al., 2007; Mäkinen et al., 2005; Milgrom et al., 2006), na saliva em repouso (Milgrom et al., 2006) e na estimulada (Haresaku et al., 2007).

I.3.3 Flúor

O flúor é dos agentes mais antigos usado como anticariogénico, por exemplo, na fluoretação das águas, pastas e colutórios orais (Thurnheer & Belibasakis, 2017). Para além do seu efeito antimicrobiano marcado, devido à difusão de ácido fluorídrico para o interior das células, inibe fortemente a desmineralização do esmalte, promovendo a remineralização (Thurnheer & Belibasakis, 2017).

Na presença de um pH baixo a nível extracelular, o ião fluoreto é transportado como ácido fluorídrico para dentro da célula bacteriana, onde depois se dissocia em H^+ e F^- . O excesso de acidificação do citoplasma poderá inibir o mecanismo de transporte de glicose para dentro da célula (Ximenes et al., 2017) pois bloqueia a enolase, enzima da via glicolítica. Ainda altera as propriedades físico-químicas dos dentes, tornando-os mais resistentes à dissolução ácida, devido à formação de fluorapatite (Sharma, Agarwal, Anand, & Jabin, 2018).

Na formulação de colutório, é usado sob a forma de fluoreto de sódio e existe para uso semanal a 0,2% e uso diário a 0,05%. Nas pastas dentífricas, as principais formas usadas são o NaF e o MFP, tendo ambos sido considerados eficazes no combate à cárie. Pastas com fluoreto de estanho ou de amina podem ser encontradas, no entanto, poucos estudos existem sobre a sua eficácia (Cury, 2001).

I.3.4 Clorohexidina

De todos os agentes antimicrobianos existentes, o que se destaca mais e que continua a ser considerado o *gold standard* é a clorohexidina (Kaushik et al., 2016; Singla et al., 2014).

Normalmente, existe sob a forma de digluconato de clorohexidina e apresenta um espectro de ação bastante amplo, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos e alguns vírus (Sala & García, 2013; Ximenes et al., 2017).

A sua grande vantagem na cavidade oral deve-se à sua elevada substantividade, ou seja, à sua capacidade de se unir a diferentes locais para poder libertar-se lentamente, de forma ativa e mantendo os seus níveis terapêuticos. Em baixas concentrações é bacteriostática, apenas inibindo o crescimento bacteriano e, em altas concentrações (0,12% ou mais) é bactericida, ou seja, mata as bactérias presentes na placa dentária (Fejerskov & Kidd, 2008; Sala & García, 2013; Ximenes et al., 2017).

Formas de apresentação

Está disponível em diferentes formulações (Tabela 2), podendo oscilar entre os 0,12% em colutórios até 35% sob forma de verniz (Sala & García, 2013; Ximenes et. al, 2017).

O profissional de saúde deve determinar a concentração, forma de apresentação, frequência e tempo de utilização da CHX em função das necessidades de cada paciente, tendo em conta o possível aparecimento de efeitos adversos.

Tabela 2 - Formas de apresentação da CHX (Adaptada de Sala & García, 2013)

<i>Colutório</i>	0,12 %
	0,2%
<i>Aerossol</i>	0,12-0,2%
<i>Pasta dentífrica</i>	0,12%
<i>Gel</i>	0,12-0,2%
	1%
<i>Verniz</i>	1%+1% timol
	10%
	35%

Efeitos adversos

A literatura mostra que a clorohexidina, a longo prazo, apresenta algumas desvantagens tais como alterar a sensação gustativa e produzir manchas castanho-amareladas nos dentes, o que é muito difícil de remover (Peedikayi et al., 2016), exigindo técnicas profissionais para a remoção das mesmas (Gbinigie, Onakpoya, Spencer, McCall MacBain, & Heneghan, 2016). Provavelmente, devido à precipitação de produtos resultantes da interação entre a CHX e os pigmentos dos alimentos, associado a uma higiene oral incompleta (Sala & García, 2013) e além disso, as gengivas e a língua podem também ser afetadas (Peedikayil, Sreenivasan, & Narayanan, 2015a). Menos frequentemente, tem sido relacionada com sensações de queimadura e ardor, boca seca (Sala & García, 2013) e efeitos colaterais gastrointestinais assim como a descamação da mucosa oral (Gbinigie et al., 2016).

Por estas razões, a clorohexidina é cada vez mais desencorajada por causa do seu sabor desagradável e dos seus efeitos colaterais indesejáveis (Pathak, 2016; Singla et al., 2014).

I.4 ÓLEOS VEGETAIS

O aumento da prevalência de efeitos adversos de muitos medicamentos sintéticos tem encorajado os cientistas a pesquisar alternativas complementares e mais naturais (Jauhari et al., 2015; Kumar & Shanbhag, 2017; Takahashi, Fukazawa, Motohira, Ochiai, & Nishikawa, 2003). Por isso, nos últimos anos, tem sido estudado um grande número de óleos e respetivos constituintes pelas suas propriedades antimicrobianas, tais como o óleo de sésamo e o óleo de coco (Bekeleski, McCombs, & Melvin, 2012; Gbinigie et al., 2016).

I.4.1 Óleo de sésamo

O óleo de sésamo é uma gordura vegetal que possui constituintes com propriedades antimicrobianas, tais como a sesamina, sesamolina e sesaminol. Contém grandes quantidades de ácidos gordos polinsaturados, como o ácido linoleico e ácido oleico, e ainda vitamina E. Além disso, é um produto que é bastante acessível (Puri, 2015; Thaweboon et al., 2013).

Nos últimos anos, foi demonstrado que este óleo possui características antibacterianas (Anand et al., 2008; Asokan et al., 2011; Asokan et al., 2009; Thaweboon et al., 2013) assim como propriedades antifúngicas e antioxidantes (Singla et al., 2014).

I.4.2 Óleo de coco

O óleo de coco é outra gordura vegetal, bastante comum, presente e recuperado da “carne” do coco (Figura 2), consumido como parte de dieta básica em muitos países tropicais. É usado na culinária e pelas suas propriedades cosméticas, e quando prensado fresco, resulta numa mistura de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, e ácidos gordos livres (Dayrit, 2015; Peedikayil et al., 2015; Shanbhag, 2017).

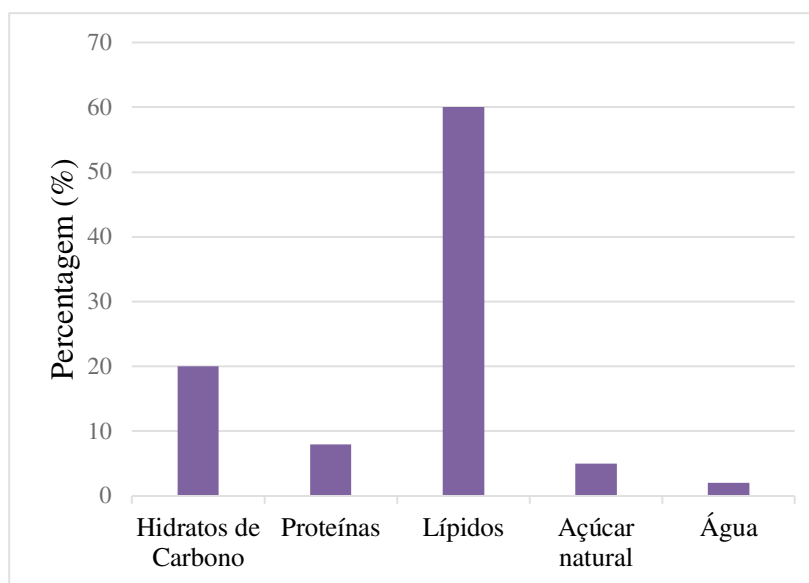


Figura 2 - Composição geral do coco (Adaptado de DebMandal & Mandal, 2011)

Difere da maioria dos outros óleos porque contém predominantemente ácidos gordos de cadeia média, dos quais 45 a 50% é ácido láurico (Tabela 3), raramente encontrado na natureza (Dayrit, 2015; Peedikayi et al., 2016; Shanbhag, 2017; Shino et al., 2016), enquanto que nos outros, a constituição básica é quase inteiramente ácidos gordos de cadeia longa, o que influencia as propriedades físicas e químicas de um óleo (Peedikayil et al., 2015). O leite materno humano é a única outra substância natural com concentrações elevadas em ácido láurico (Peedikayi et al., 2016; Peedikayil et al., 2015; Shanbhag, 2017).

Tabela 3 - Composição do óleo de coco em ácidos gordos (Adaptada de Peedikayi et. al., 2016)

Ácido Gordo	Intervalo (%)	Média
Capróico	0.4-0.6	0.5
Caprílico	6.9-9.4	7.8
Cáprico	6.2-7.8	6.7
Láurico	45.9-50.5	45.5
Mirístico	16.8-19.2	18.1
Palmético	7.7-9.7	8.8
Esteárico	2.3-3.2	2.6
Oleico	5.4-7.4	6.2
Lanoleico	1.3-2.1	1.6

Num estudo feito na Índia, o óleo de coco demonstrou possuir atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans* (Sharath Asokan et al., 2009). Além disso, foram publicados vários estudos que comprovam as propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas do ácido láurico tanto *in vitro* como *in vivo* (Peedikayi et al., 2016; Peedikayil et al., 2015). Entre os ácidos gordos saturados, este tem demonstrado ser eficaz contra bactérias Gram positivo e Gram negativo, e alguns vírus e fungos (Dayrit, 2015; Puri, 2015) assim como, em estudos microscópicos, concluiu-se que consegue romper as membranas celulares (Ogbolu, Oni, Daini, & Oloko, 2007).

Outros investigadores propuseram que a atividade única da monolaurina pode ser devido à ação antimicrobiana do composto em si e ao produto da sua hidrólise, o ácido láurico. Confirmou-se ainda que vários compostos que contenham ésteres laurílicos têm propriedades antimicrobianas e que, péptidos conjugados com ácido láurico mostram maior atividade antimicrobiana em comparação com péptidos não conjugados. Este aumento na atividade antimicrobiana foi atribuído a uma mudança na estrutura helicoidal, devido ao ácido láurico, que permite aos péptidos interagir melhor com as membranas bacterianas. Também derivados de ácido láurico conjugados com hidratos de carbono têm-se mostrado promissores como inibidores de crescimento de microrganismos patogénicos alimentares (Dayrit, 2015).

Por conseguinte, a atividade do ácido láurico, monolaurina e derivados ésteres foi classificada em três principais mecanismos: destruição de membranas celulares de bactérias Gram-positivo e vírus revestidos de lípidos, através de processos químicos; interferência nos processos celulares, como transdução de sinal, transcrição, produção de energia e transferência de nutrientes (DebMandal & Mandal, 2011; Kaushik et al., 2016; Shanbhag, 2017; Shino et al., 2016; Thaweboon et al., 2013), e estabilização de membranas celulares humanas. A disponibilidade destes mecanismos múltiplos poderá ser uma das razões pelas quais as bactérias foram incapazes de criar resistências contra a ação destes compostos (Dayrit, 2015). No caso dos vírus, o efeito viricida da monolaurina parece dever-se à solubilização dos lípidos e fosfolípidos do invólucro viral, levando à desintegração das partículas virais (Thaweboon et al., 2013).

I.4.3 Oil pulling

Não só pelos estudos efetuados até ao momento, mas também por a população em geral cada vez querer adotar uma abordagem mais holística, natural e integrativa no que toca à saúde, o conceito do *oil pulling* foi então redescoberto (Puri, 2015).

I.4.3.1 Conceito

O conceito do *oil pulling* foi familiarizado pelo Dr. Karach, nos anos 90, na Rússia, e refere-se a um procedimento que envolve bochechar com um óleo, acreditando-se que cure cerca de trinta patologias, desde dores de cabeça e enxaquecas a diabetes e asma, entre outras (Lakshmi et al., 2013; Pathak et al., 2016; Puri, 2015). É um remédio popular tradicional da Índia que se alega estar relacionado com benefícios na saúde oral e sistémica (Singla et al., 2014; Sood, Devi M, Narang, V, & Makkar, 2017), podendo ser realizado usando óleos comestíveis como óleo de girassol, óleo de sésamo ou óleo de coco (Asokan et al., 2008; Asokan, Rathinasamy, et al., 2011; Kaushik et al., 2016; Lakshmi et al., 2013). Durante muitos anos, foi usado extensivamente para evitar a cárie dentária, mau odor, hemorragia gengival, secura da garganta, lábios gretados e fortalecimento dos dentes, gengivas e mandíbula (Asokan et al., 2008; Lakshmi et al., 2013; Pathak et al., 2016; Puri, 2015; Singh & Purohit, 2011).

Nos dias de hoje, continua a ser usado como terapia da Medicina Ayurvédica para a manutenção da higiene oral. A Ayurveda é um sistema holístico tradicional da medicina nativa que evoluiu na Índia, há cerca de 3000-5000 anos, e atualmente é praticada em várias partes do mundo como medicina complementar e alternativa (CAM). Ao longo dos séculos, esta prática levou ao desenvolvimento de um grande número de procedimentos cirúrgicos e medicamentos, para o tratamento de várias doenças, que incluem ervas e produtos à base de plantas. E, embora a medicina dentária não fosse um ramo especializado da Ayurveda, foi incluído no seu sistema (Singh & Purohit, 2011).

Apesar desta denominação ter ficado conhecida pelo Dr. Karach, este procedimento foi mencionado antes no texto ayurvédico ‘Charak Samhita’ e ‘Sushruta Samhita’ como "Kavala Graha" ou "Kavala Gandoosha" (Asokan et al., 2008; Asokan et al., 2009; Kumar & Shanbhag, 2017; Peedikayil, Sreenivasan, & Narayanan, 2015b), tendo sido descrito vários tipos de ‘Gandoosh’, cada um com as suas indicações e contra-indicações (Sooryavanshi & Mardikar, 1994).

De um modo geral, a medicina tradicional tem vindo a tornar-se a soma total de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas em diferentes culturas que são usadas para manter a saúde, bem como prevenir, diagnosticar, melhorar ou tratar doenças físicas e mentais (Singh & Purohit, 2011).

I.4.3.2 Procedimento

Segundo vários autores, este método consiste exatamente em colocar uma colher de sopa (ou uma colher de chá para crianças) de óleo na boca, bochechando entre os dentes durante um período de tempo que pode variar entre os 3 a 20 min. O óleo viscoso fica com uma consistência fina, em tons de branco leitoso e alega-se que esta ação ative um grande número de enzimas e que drene as toxinas do sangue.

Após o processo de ativação concluído, o óleo não deve ser engolido por conter bactérias e toxinas, deve ser preferencialmente descartado numa toalha de papel pois pode causar entupimento de tubagens e, deve seguir-se a escovagem. Acredita-se no seu máximo potencial fazê-lo no período da manhã, de estômago vazio, antes de escovar os dentes, e até três vezes diariamente, e é contra- indicado para crianças menores de 5 anos, devido ao risco de aspiração do óleo (Anand et al., 2008; Asokan et al., 2008; Asokan et al., 2009; Asokan, Emmadi, Sivakumar, Kumar, & Raghuraman, 2011; Kaushik et al., 2016; Lakshmi et al., 2013; Pathak et al., 2016; Shanbhag, 2017).

Alguns estudos científicos confirmaram o efeito do *oil pulling* contra bactérias específicas na cavidade oral, mas embora tenha sido descoberto ser uma terapia eficaz para melhorar a saúde oral, a parte mais questionável deste procedimento é que requer motivação suficiente para o aceitar e executar (Singla et al., 2014).

I.4.3.3 Mecanismo de ação

Muitos autores geraram várias hipóteses (Hebbar, Keluskar, & Shetti, 2010; Kaushik et al., 2016; Peedikayil et al., 2015a; Sood, Devi M, Narang, V, & Makkar, 2014), no entanto, Asokan e colaboradores (2011) efetuaram um estudo *in vitro* de modo a compreender o mecanismo pelo qual o *oil pulling* poderia atuar na diminuição do índice de placa e gengival, com recurso ao óleo de sésamo. Concluiu que, durante o bochecho, ocorrem processos de **emulsificação** e **saponificação** (Sharath Asokan, Rathinasamy, et al., 2011).

A **emulsificação** é um processo que começa após 5 minutos de bochecho (Shanbhag, 2017), pelo qual gorduras insolúveis são decompostas em gotículas minúsculas e dispersas em água (Kaushik et al., 2016). Devido às forças mecânicas de cisalhamento exercidas aquando o bochecho, a área de superfície do óleo aumenta, reforçando a ação de limpeza. A camada de óleo formada nas superfícies dentárias e gengiva poderá reduzir a formação de placa e co-agregação bacteriana (Peedikayil et al., 2015).

A **saponificação** é outro processo no qual os componentes alcalinos da saliva reagem com o óleo, resultando uma substância tipo sabão (Kaushik et al., 2016). Tanto o óleo de coco como o óleo de sésamo reagem facilmente com o hidróxido de sódio presente na saliva, durante o *oil pulling*, formando o laureato de sódio (Figura 3), principal constituinte do sabão, que poderá ser responsável pela ação de limpeza e diminuição da acumulação de placa (Kumar & Shanbhag, 2017; Peedikayil et al., 2015). A própria emulsificação do óleo ajuda na formação desta camada viscosa que altera a adesão das bactérias às superfícies dos dentes (Gbinigie et al., 2016), que, por conseguinte, inibe a sua agregação, e remove células escamosas superficiais (Jauhari et al., 2015; Pathak et al., 2016; Peedikayil et al., 2016). Por estas razões, o óleo de coco é dos óleos mais comumente usado em sabonetes, pelo seu elevado teor de saponificação, levando a uma ação de limpeza aumentada (Peedikayil et al., 2015).

Ainda que não possa ser recomendado como tratamento adjuvante até ao momento, tendo sempre em conta de que não reverte lesões cariosas (Shanbhag, 2017), o *oil pulling* poderá ser considerado como um procedimento preventivo para a manutenção da higiene oral (Asokan et al., 2008; Kaushik et al., 2016).

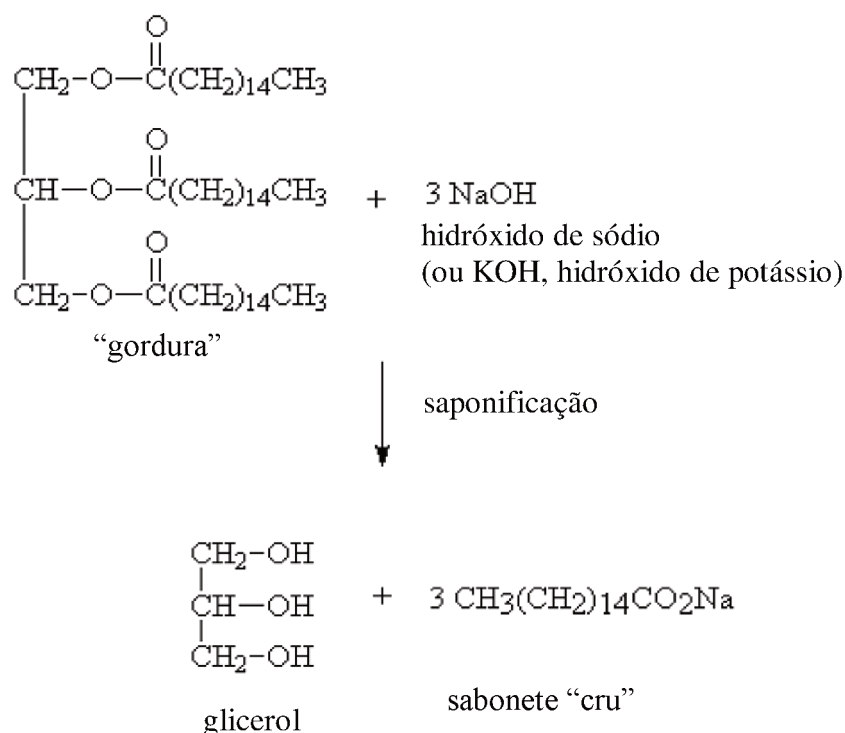


Figura 3 - Reação de saponificação (Adaptado de Peedikayil et. al., 2015)

I.4.3.4 Vantagens do *oil pulling*

Não existe literatura suficiente (Gbinigie et al., 2016) mas existem muitas vantagens neste “remédio *ayurvédico*”.

O que torna este método tão inovador e interessante é o facto de ser extremamente simples e fácil de executar assim como ajudar na prevenção de doenças gengivais e cárie dentária pelo que diminui a acumulação de placa e agregação bacteriana (Puri, 2015).

De forma indireta, “branqueia” os dentes (Puri, 2015) e também ajuda na prevenção da halitose (Asokan, Emmadi, et al., 2011; Hebbar, 2014; Lakshmi et al., 2013; Singla et al., 2014), xerostomia, garganta seca e lábios gretados (Puri, 2015).

Como já foi referido, acredita-se na desintoxicação do corpo através do *oil pulling* e na redução de sintomas como dores de cabeça, enxaqueca e alergias (Sharath Asokan, 2008; Lakshmi et al., 2013; Pathak et al., 2016; Singh & Purohit, 2011). E, ao contrário da clorhexidina, este procedimento não causa manchas nos dentes, nem provoca alergias ou alterações de gosto (Asokan et al., 2008; Gbinigie et al., 2016; Hebbar et al., 2010;

Kumar & Shanbhag, 2017; Lakshmi et al., 2013; Singla et al., 2014; Sood et al., 2014; Thaweboon et al., 2013).

Os óleos usados são acessíveis e facilmente poderão estar disponíveis em casa (Puri, 2015) e foi confirmado, através de um estudo *in vivo*, que o extrato de *cocos nucífera* (óleo de coco) apresenta baixa toxicidade, não induzindo reações dérmicas ou oculares (DebMandal & Mandal, 2011).

I.5 PERTINÊNCIA DO ESTUDO

Dada a crescente evidência da relação entre saúde oral e saúde geral, o médico dentista deve, cada vez mais, estar informado sobre estudos recentes e ter conhecimento sobre todas as possibilidades e técnicas inovadoras complementares e eficazes na prevenção de doenças orais.

Isto, porque deve procurar atender às necessidades de pacientes que desejem evitar álcool, conservantes e sabores artificiais, prescrevendo produtos com ingredientes ativos naturais que apresentem igualmente efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios (Haffajee, Yaskell, & Socransky, 2008).

I.6 OBJECTIVOS DE ESTUDO

Este estudo pretende avaliar a capacidade inibitória *in vitro* do óleo de coco e do óleo de sésamo sobre bactérias cariogénicas, como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, e ainda *Streptococcus mitis*, e comparar a sua eficácia com outros colutórios extensamente utilizados na prática clínica.

I.7 HIPÓTESES DE ESTUDO

As hipóteses colocadas para o estudo são:

- Não existe uma redução significativa de contagem de bactérias cariogénicas, quando se aplica óleo de coco/sésamo versus outros colutórios.
- Existe uma redução de contagem de bactérias cariogénicas, quando se aplica óleo de coco/sésamo versus outros colutórios.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 Local de estudo

O estudo foi realizado nas instalações do Instituto Universitário Egas Moniz, no laboratório de Microbiologia Aplicada, entre maio e junho de 2018.

II.2 Tipo de estudo

Foi executado um estudo observacional em três espécies bacterianas diferentes: *Streptococcus mutans* ATCC 25176, *Lactobacillus* CIP A159 e *Streptococcus mitis* ATCC 6269. Selecionaram-se 6 óleos vegetais diferentes, 3 de óleo de coco e 3 de óleo de sésamo, os quais foram aplicados através de diferentes estratégias para avaliar a atividade antimicrobiana nas bactérias escolhidas.

II.3 Seleção dos óleos

Os óleos vegetais foram escolhidos, aleatoriamente, após breve pesquisa dos produtos existentes no mercado. Dado que o método de extração dos óleos era semelhante na maioria, foram selecionados 3 óleos de coco (100% Pure Coconut Oil KHANUM 250 mL, Óleo Extra Virgem de Coco ORIGENS 200 mL, 100% Óleo de Coco Extra Virgem SEARA 270 mL) aos quais foram atribuídos a nomenclatura AC, BC e CC, respetivamente (Figura 4); e 3 óleos de sésamo (Óleo de Sementes de Sésamo ASIA GREEN GARDEN 250 mL, Óleo de Sésamo Virgem HAITOGLOU BROS 250 mL, Óleo de Sésamo YOUWOK.COM 145 mL) aos quais foram atribuídos a nomenclatura AS, BS e CS, respetivamente (Figura 5).



Figura 4 - Óleos de coco selecionados



Figura 5 - Óleos de sésamo selecionados

II.4 Grupos de controlo

Como grupo de controlo negativo, utilizou-se água destilada estéril (ADE) e, como grupos de controlo positivo, foram escolhidos três produtos: Clorohexidina 0,12% LACER® colutório 200 mL (Figura 6), Monofluorofosfato de sódio 0,05% + Xilitol 3,33% VITIS® Anticaries colutório 500 mL (lote K1006) (Figura 7) e Clorohexidina 0,2%, obtida a partir de diluição de digluconato de clorohexidina SIGMA® solução 100 mL (lote BCBM3595V) (Figura 8).



Figura 6 - Clorohexidina 0,12% (LACER® colutório 200 ml)



Figura 7 - Monofluorofosfato de sódio 0,05% + Xilitol 3,33% (VITIS® Anticaries colutório 500 ml, lote K1006)



Figura 8 - Clorohexidina 0,2%, diluição de digluconato de clorohexidina (SIGMA® solução 100 ml, lote BCBM3595V)

II.5 Metodologia

Os ensaios foram efetuados de acordo com os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), pelo método de difusão em disco e pelo método de diluição em meio líquido.

II.5.1 PREPARAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS

Os microrganismos (Figura 9) foram inoculados em meios de cultura apropriados para a sua expansão, sendo que *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* em Mitis Salivarius Agar (MSA), e *Lactobacillus spp.* em Rogosa Agar (RA). Os meios de MSA inoculados foram a incubar a 37°C, durante 48h, em anaerobiose, e os meios de RA inoculados foram a incubar a 30°C durante 48h, em aerofilia.

Após crescimento, prepararam-se suspensões de cada microrganismo a testar com um conteúdo microbiano aproximado de 10^8 ufc/ml (0,5 escala de MacFarland para bacilos e 1 McF para cocos).

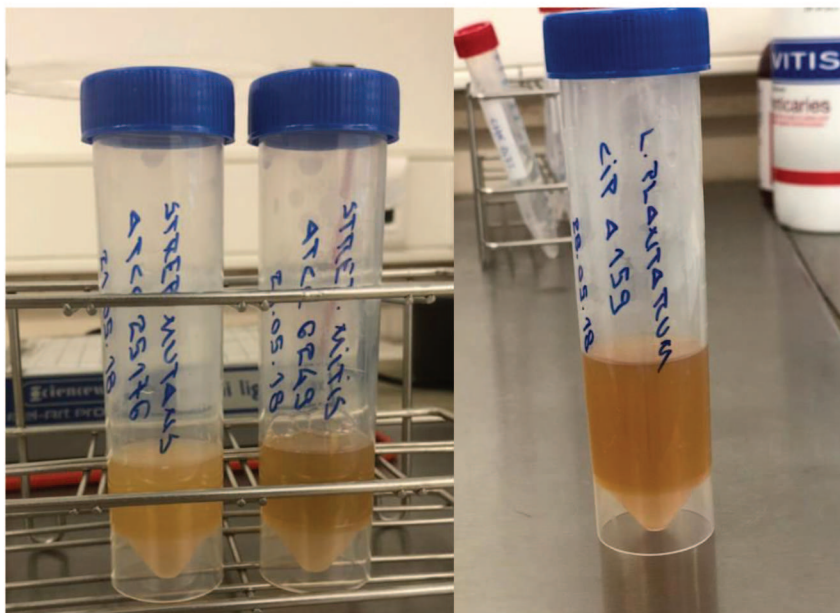


Figura 9 - *S. mutans* ATCC 25176, *S. mitis* ATCC 6249 e *L. plantarum* CIP A159, cedido pelo laboratório de Microbiologia

II.5.2 MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR

Os microrganismos foram inoculados em Mueller Hinton com sangue, por espalhamento utilizando uma zaragatoa. E, de seguida, sobre o meio, foram colocados discos de papel estéreis, nos quais foram colocados 15 μ l de cada amostra a testar ou de controlo (Figura 10). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

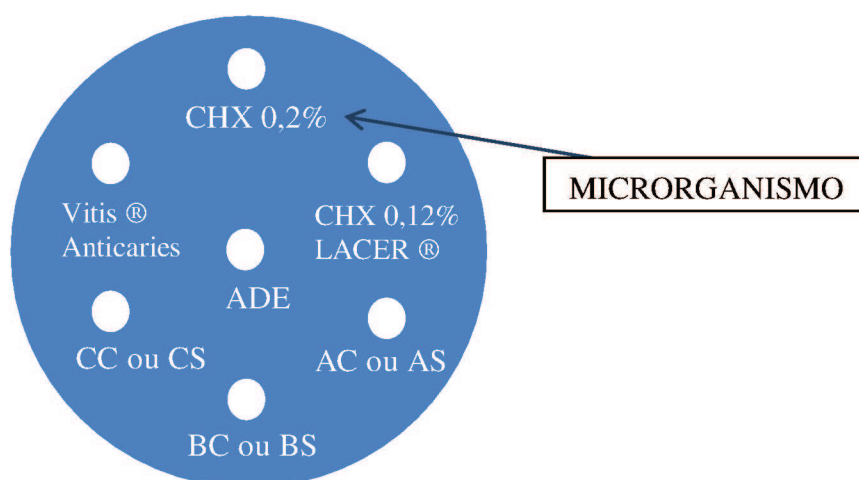


Figura 10 - Esquema do método de difusão em disco

As placas foram a incubar a 37°C em atmosfera de anaerobiose para *Streptococcus* (Figura 11) e a 30°C em atmosfera de aerofilia para *Lactobacillus*. E, após a incubação, foi verificada a existência de inibição (ou não) de crescimento dos microrganismos testados.



Figura 11 - Colocação das placas para *Streptococcus* em caixa com gerador de anaerobiose

II.5.3 MÉTODO DE DILUIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

A partir das suspensões feitas inicialmente, fizeram-se diluições decimais de modo a obter suspensões com um conteúdo aproximado de 10^6 e 10^4 ufc/ml, sendo que desta última, inoculou-se, por espalhamento, 100 µl em gelose de sangue, para determinar a concentração bacteriana inicial.

As placas foram a incubar a 37°C em anaerobiose, para *S. mutans* e *S. mitis*, e a 30°C em microaerofilia, para *L. plantarum* e, de seguida, efetuou-se o ensaio com os óleos de coco e de sésamo. Foram preparados 22 tubos para cada microrganismo, onde cada tubo iria conter 1 ml da suspensão bacteriana feita inicialmente, com o conteúdo aproximado de 10^8 ufc/ml, sendo adicionado posteriormente ao respetivo tubo, 1 ml dos produtos a testar ou dos controlos positivos ou negativos (Figura 12). As amostras (os óleos) foram testadas em triplicado.

Os tubos foram a incubar em estufa com agitador a 37°C para *S. mutans* e *S. mitis*, e a 30°C para *L. plantarum*, e os resultados foram observados após 24h. Os tubos que não apresentavam turvação foram repicados para meios de cultura de gelose de sangue para *Streptococcus* e Rogosa agar para *Lactobacillus*.

Esta foi a metodologia que nos permitiu, de um ponto de vista qualitativo, avaliar a presença ou não de crescimento microbiano.

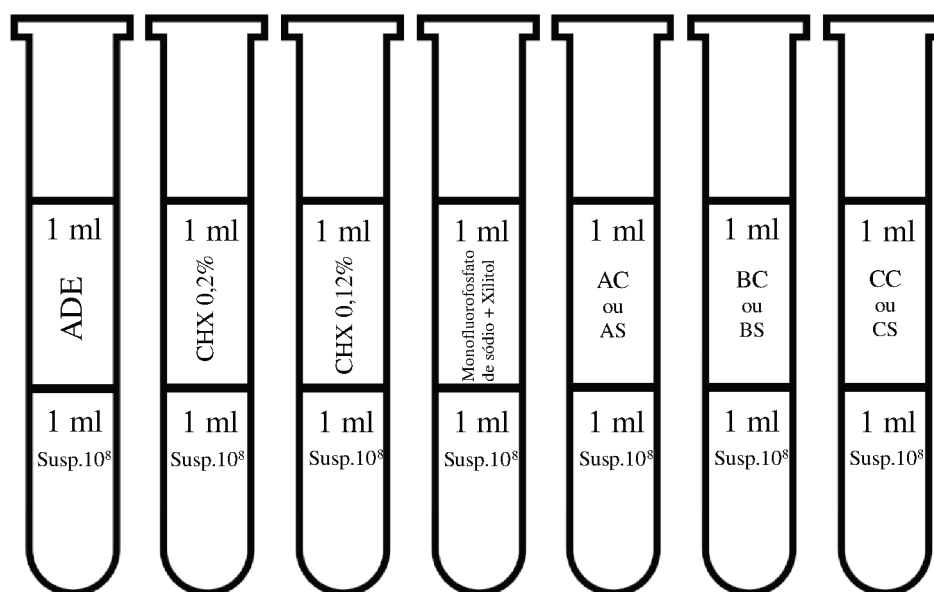


Figura 12 - Esquema do método de diluição em meio líquido (esquema não está à escala)

Utilizando o mesmo método, foi testada a possibilidade de os óleos em estudo poderem ter algum efeito inibidor em conteúdos bacterianos mais baixos. Para este estudo, utilizou-se apenas para *S. mutans*.

A partir da suspensão inicial com um conteúdo aproximado de 10^8 ufc/ml, foram efetuadas diluições decimais até obter suspensões com conteúdos aproximados de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 ufc/ml (Figura 13), onde a partir das suspensões com um conteúdo de 10^3 e 10^2 ufc/ml, foram repicados 100 μ l de cada para gelose de sangue e incubou-se na estufa a 37°C em anaerobiose, para determinar a concentração bacteriana inicial. Apenas se utilizaram as amostras A de óleo de coco e de óleo de sésamo para se realizar este estudo final, que consistiu em colocar em cada tubo 1ml da suspensão bacteriana (1 tubo para cada concentração bacteriana) e adicionar de seguida 1 ml do óleo a testar ao respetivo tubo (Figura 14). Os tubos foram a incubar na estufa com agitador a 37°C e os resultados observados após 24h.

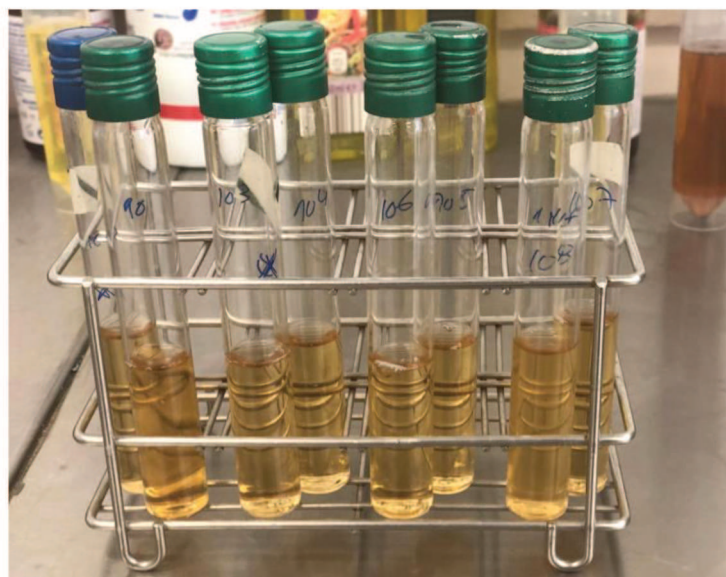


Figura 13 - Suspensões bacterianas com conteúdos aproximados de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 ufc/ml de *S. mutans*

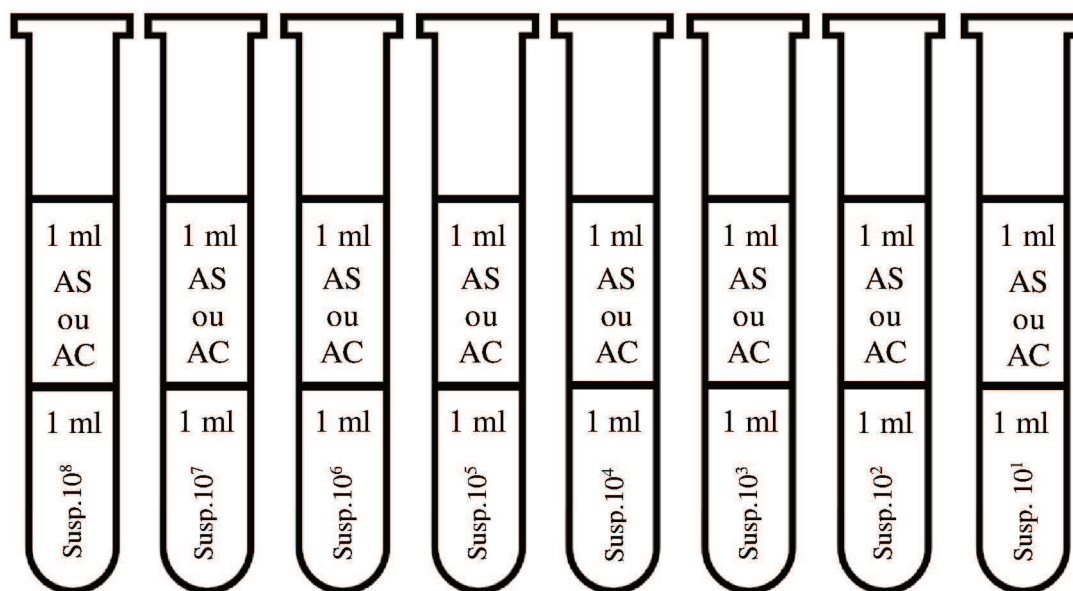


Figura 14 - Esquema do método de diluição em meio líquido com conteúdos microbianos mais baixos - concentrações decrescentes (esquema não está à escala)

III. RESULTADOS

III.1 MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

Na tabela 4 é possível verificar a presença (+) ou não (-) de halo de inibição para as amostras e controlos testados.

Para a água destilada estéril, não houve formação de halo de inibição, o que era de esperar do controlo negativo.

Para a CHX tanto 0,2% como 0,12%, houve formação de halo de inibição (à volta dos discos), o que era de esperar do controlo positivo.

Para o Monofluorofosfato de Sódio 0,05% + Xilitol 3,33% não houve formação de halo de inibição no disco.

Para as variáveis em estudo (AC, BC, CC, AS, BS e CS) não houve formação de halo de inibição nos discos.

Estes resultados foram consistentes, independentemente, da bactéria em estudo.

Tabela 4 - Resultados do método de difusão em disco

	Formação de halo de inibição
Clorhexidina 0,2%	+
Clorhexidina 0,12% LACER®	+
Monofluorofosfato sódio 0.05% + Xilitol 3,33% VITIS ® Anticaries	-
Água Destilada Estéril	-
AS	-
BS	-
CS	-
AC	-
BC	-
CC	-

No seguimento dos resultados obtidos por este método, empregámos um outro método testando também a sua sensibilidade. A razão que esteve subjacente a esta decisão foi ou os óleos não conseguiram difundir-se pelo ágar ou os óleos não possuem qualquer ação antibacteriana sobre estas três bactérias.

Pode observar-se na figura 15, o resultado referente ao método de difusão em disco, realizado para *Streptococcus mutans*, com óleo de sésamo, e na figura 16, para *Streptococcus mitis*, com óleo de coco.

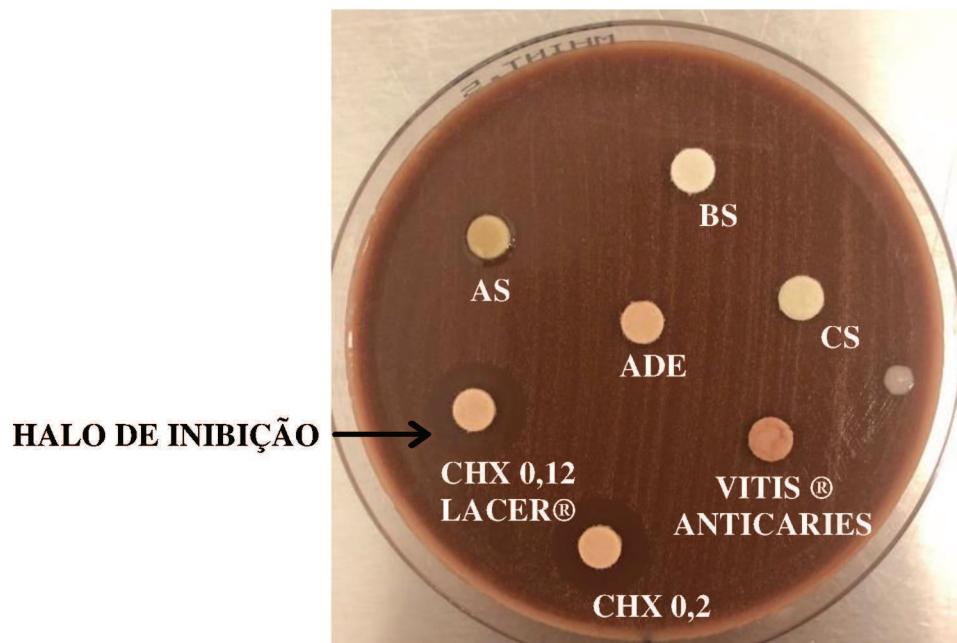


Figura 15 - Resultados obtidos pelo método de difusão em disco para *S. mutans*, utilizando o óleo de sésamo

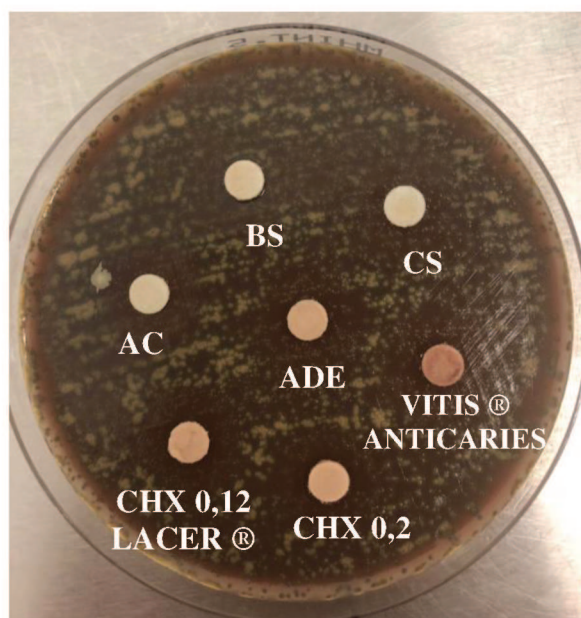


Figura 16 - Resultados obtidos pelo método de difusão em disco para *S. mitis*, utilizando o óleo de coco

III.2 MÉTODO DE DILUIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

Na tabela 5, é possível verificar a presença (+) ou não (-) de crescimento para as amostras e controlos testados para *S. mutans* e *S. mitis*, onde o inóculo inicial era de $4,4 \times 10^7$ ufc/ml.

Para a água destilada estéril, houve presença de turvação, pelo que houve crescimento bacteriano, o que era de esperar do controlo negativo.

Para a CHX, tanto 0,2% como 0,12%, não se observou turvação, o que era de esperar do controlo positivo. O mesmo resultado foi obtido com o Monofluorofosfato de Sódio 0,05% + Xilitol 3,33%.

Para as amostras em estudo (AC, BC, CC, AS, BS e CS) observou-se presença de turvação, o que indica crescimento bacteriano.

A tabela 6 apresenta os resultados para as amostras e controlos testados para *L. plantarum*, onde o inóculo inicial era de $9,5 \times 10^6$ ufc/ml. Os resultados para *Lactobacillus spp.* foram semelhantes aos resultados para *Streptococcus spp.*

Tabela 5 - Resultados do método de diluição para *S. mutans* e *S. mitis*

	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>
Clorohexidina 0,2%	-	-
Clorohexidina 0,12% LACER®	-	-
Monofluorofosfato sódio 0.05% + Xilitol 3,33% VITIS ® Anticaries	-	-
Água Destilada Estéril	+	+
AS	+	+
BS	+	+
CS	+	+
AC	+	+
BC	+	+
CC	+	+

Tabela 6 - Resultados do método de diluição para *L. plantarum*

	<i>L. plantarum</i>
Clorohexidina 0,2%	-
Clorohexidina 0,12% LACER®	-
Monofluorofosfato sódio 0.05% + Xilitol 3,33% VITIS ® Anticaries	-
Água Destilada Estéril	+
AS	+
BS	+
CS	+
AC	+
BC	+
CC	+

Os resultados do método de diluição com conteúdos bacterianos mais baixos, entre 10^8 e 10^1 ufc/ml (Figura 17.1 e 17.2), onde se averiguou a ação dos óleos apenas em *S. mutans*, estão descritos na tabela 7.

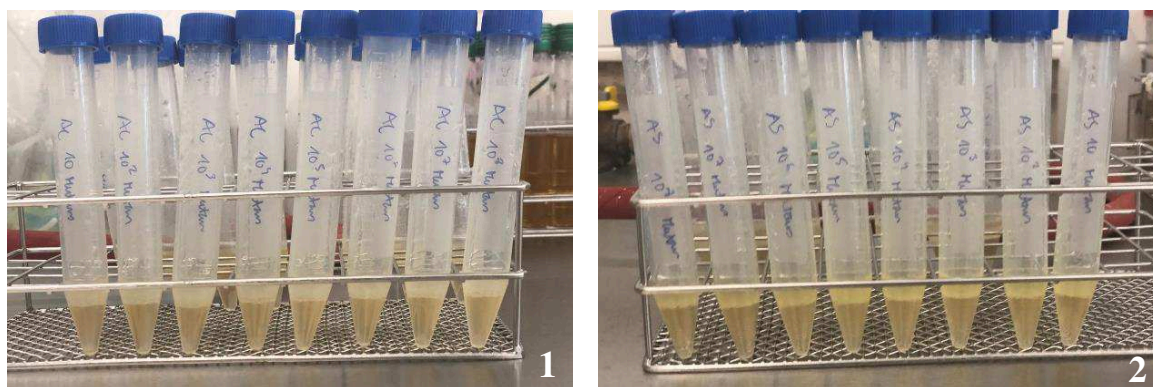


Figura 17 - (1) Resultados do método de diluição para *S. mutans* para AC (2) Resultados do método de diluição para *S. mutans* para AS

Tabela 7 - Resultados do método de diluição para *S. mutans* para conteúdos bacterianos de 10^8 a 10^1 ufc/ml

	<i>S. mutans</i>
AC + 10^8 ufc/ml	+
AC + 10^7 ufc/ml	+
AC + 10^6 ufc/ml	+
AC + 10^5 ufc/ml	+
AC + 10^4 ufc/ml	+
AC + 10^3 ufc/ml	+
AC + 10^2 ufc/ml	+
AC + 10^1 ufc/ml	+
AS + 10^8 ufc/ml	+
AS + 10^7 ufc/ml	+
AS + 10^6 ufc/ml	+
AS + 10^5 ufc/ml	+
AS + 10^4 ufc/ml	+
AS + 10^3 ufc/ml	+
AS + 10^2 ufc/ml	-
AS + 10^1 ufc/ml	-

Nos conteúdos bacterianos 10^2 e 10^1 , da amostra AS, não se observou a presença de turvação, pelo que se repicaram 100 μ l de cada amostra para meio apropriado, para verificar se o microrganismo tinha sido destruído. Verificou-se crescimento em ambas as placas o que nos indica que os óleos inibiram o crescimento de conteúdos baixos de microrganismos, mas mesmo nesses baixos conteúdos, não as conseguiram destruir, apresentando apenas atividade bacteriostática.

Resumindo, os resultados indicam que os grupos de controlo positivo foram eficazes na inibição do crescimento bacteriano e, como era presumível, o grupo de controlo negativo não tem qualquer ação inibitória nos microrganismos estudados. As variáveis em estudo (AC, BC, CC, AS, BS e CS) também demonstraram que não têm qualquer ação direta antimicrobiana contra *S. mutans*, *L. plantarum* e ainda *S. mitis*.

IV. DISCUSSÃO

Na atualidade, são vários os métodos usados para avaliar a atividade antibacteriana de extratos vegetais sendo que o método de difusão em ágar e método de diluição são os mais utilizados (Ostrosky et al., 2008).

Neste estudo foram utilizados diferentes óleos vegetais, tais como óleo de coco e óleo de sésamo, com o intuito de avaliar a capacidade inibitória *in vitro* destes sobre bactérias cariogênicas (*Streptococcus Mutans* e *Lactobacillus spp*) e ainda sobre *Streptococcus Mitis*, comparando com outros colutórios extensamente utilizados na prática clínica, como Clorohexidina 0,2%, Clorohexidina 0,12% e Monofluorofosfato de Sódio 0.05% + Xilitol 3.33%. Para se determinar essa capacidade, foram efetuados ensaios, de acordo com os critérios do CLSI, pelo método de difusão em disco e pelo método de diluição em meio líquido.

IV.1 Método de difusão em disco

O método de difusão em agar em placas de petri é uma prática usual em microbiologia, para avaliar os efeitos bactericidas de diferentes substâncias (Ximenes et al., 2017), que se limita a microrganismos de crescimento rápido (Ostrosky et al., 2008). Por esta razão, tem sido utilizado em vários estudos *in vitro* (Asokan, Rathinasamy, et al., 2011; Ogbolu, Oni, Daini, & Oloko, 2007; Shino et al., 2016; Ximenes et al., 2017).

O resultado do grupo-controlo negativo, correspondente à água destilada estéril, não apresentou halo de inibição no disco, o que significa que não houve inibição das bactérias. Este resultado é concordante com um estudo feito por Kaushik et. al. (2016) em que não houve redução da contagem bacteriana após bochecho com 5 ml de água destilada durante 14 dias.

A formação de halos de inibição à volta dos discos dos grupos-controlo positivo, referente à CHX 0,12% e 0,2%, revelam a sua eficácia contra o crescimento bacteriano. Num estudo feito, através do mesmo método, a CHX 0,2% apresentou atividade antimicrobiana significativa contra *C. albicans*, com uma zona média de inibição de 21,8mm, e a diferença com o antifúngico utilizado não foi estatisticamente significativa (Shino et al., 2016).

A clorohexidina, para além de ter propriedades bactericidas, também apresenta características fungicidas, sendo capaz de inibir a adesão de *Candida* a superfícies biológicas e inertes (Shino et al., 2016).

Do mesmo modo, Ximenes et. al., em 2017, estudou o efeito de CHX 0,12% em *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis* e comprovou a sua eficácia na redução do número destas três espécies.

A cloroheixidina é, por isso, considerada o agente anti-placa e anti-gengivite mais eficaz estudado e os vários efeitos colaterais associados ao seu uso, é que levaram a uma pesquisa por produtos alternativos (Brex, Macdonald, Legary, Cheang, & Forgay, 1993).

O grupo-controlo positivo, correspondente ao Monofluorofosfato de Sódio 0,05% + Xilitol 3,33%, não apresentou produção de um halo significativo à volta dos discos, podendo significar que este produto não possui qualquer ação antibacteriana. Não existem estudos desta associação segundo estas percentagens, no entanto, existem com percentagens diferentes e de cada um individualmente.

Ximenes et. al., em 2017, observou que Fluoreto de Sódio a 5% é capaz de inibir totalmente o crescimento de bactérias. Outros estudos sobre colutórios fluoretados mostraram uma redução acentuada na contagem de *S. mutans* (Jauhari et al., 2015; Sharma et al., 2018). E ainda, em vários estudos *in vitro* e alguns feitos em animais, demonstrou-se que o flúor é eficaz contra *S. mutans* (Maden, Altun, Ozemn, & Basak, 2018).

Em relação ao xilitol, foi documentado através de ensaios clínicos, que possui um efeito bacteriostático (Maden et al., 2018). Uma ampla gama de estudos *in vitro* mostraram que a maioria dos microrganismos orais não metaboliza o xilitol em produtos ácidos. Além disso, foi referido que tem efeitos inibidores de crescimento e adesão em algumas bactérias orais (Arunakul, Thaweboon, Thaweboon, Asvanund, & Charoenchaikorn, 2011).

Os principais resultados foram que colutórios com formulação 0,05% de NaF + 12,5% de Xilitol mostram uma redução significativa de *S. mutans* em 5 semanas (Arunakul et al., 2011).

Relativamente aos grupos em estudo (AC, BC, CC, AS, BS e CS) não houve inibição do crescimento bacteriano, o que é concordante com um estudo feito por Jauhari et al. (2015) em que 52 crianças foram instruídas a fazer bochechos com óleo de sésamo, duas vezes ao dia, durante duas semanas, mas que, após contagem de *S. mutans* através do Oratest e Dentocult SM Strip mutans kit, o bochecho não mostrou resultados promissores na redução da colonização bacteriana. Não obstante, outros autores usando o mesmo método (Dentocult SM Strip mutans kit), mostraram resultados positivos a favor

do *oil pulling*, nos quais o óleo de coco foi tão eficaz como um colutório de clorohexidina (Asokan et al., 2008; Peedikayi et al., 2016).

Apesar disso, uma revisão sistemática foi feita sobre o efeito deste procedimento na promoção da higiene oral (Gbinigie et al., 2016) e outro artigo que reuniu todos os estudos feitos sobre o *oil pulling* na redução de várias condições orais como gengivite, cárie dentária, halitose e xerostomia (Bekeleski et al., 2012).

No estudo de Sood, Devi M, Narang, V, & Makkar, em 2017, um grupo de 60 raparigas foram instruídas a bochechar com 15 ml de cada amostra em estudo diariamente, durante 21 dias e o *oil pulling* revelou a mesma eficácia que a clorohexidina na redução do mal odor oral e dos microrganismos causadores, ainda que seja importante referir que o grupo que fez o bochecho com o óleo achou a duração do bochecho demasiado longa, apesar de ter havido habituação após primeira e segundas tentativas. Estes resultados confirmaram os achados de um outro estudo feito alguns anos antes (Asokan, Kumar, Emmadi, Raghuraman, & Sivakumar, 2011). Ainda relativamente à halitose, foi realizado um estudo que comparou, para além do óleo de sésamo, um outro óleo na redução da halitose em mulheres grávidas – óleo de farelo de arroz e comparou com bochechos de clorohexidina, no qual houve uma redução significativa da halitose, no início e 14 dias após a intervenção para os três grupos (Sheikh & Iyer, 2016)

No estudo de Anand et al., em 2008, foi estudado este mesmo procedimento mas sobre bactérias cariogénicas, durante 40 dias e os resultados mostraram o efeito antibacteriano do óleo de sésamo, sendo que a redução rondou os 10 a 33,4% e que houve uma notável diminuição na suscetibilidade para o desenvolvimento da cárie.

Em 2009, Asokan et al., para avaliar o efeito do óleo de sésamo na formação de placa e comparar a sua eficácia com colutórios de clorohexidina, mediu índices de placa e índices gengival e verificou que houve uma redução estatisticamente significativa nos respetivos valores dos grupos controlo e de estudo ($p < 0,001$ em ambos) e do número de colónias de adolescentes com gengivite induzida por placa. Assim como Kaushik et al., em 2016, que verificou exatamente os mesmos resultados para o óleo de sésamo na contagem de *S. mutans*, após 15 e 30 dias de bochecho.

Num estudo em 2013, foi avaliado o efeito do *oil pulling* em microrganismos orais presentes em biofilmes, que foram expostos a óleo de coco, milho, farelo de arroz, palma, sésamo, girassol e soja. As conclusões foram que o óleo de coco exibe atividade antibacteriana contra *S. mutans* e *Candida albicans*, enquanto o óleo de sésamo contra *S. mutans* e o óleo de girassol apenas atividade antifúngica. Todos os outros não

apresentaram qualquer capacidade inibitória contra o crescimento destes microrganismos (Thaweboon et al., 2013).

E na perspetiva de pessoas com pouca destreza manual, Singla et al., em 2014, estudou o efeito da massagem gengival com 3 óleos diferentes (óleo de sésamo, azeite e óleo de coco) durante um mês e verificou que houve uma diminuição significativa nos valores de *S. mutans*, *Lactobacillus*, índice gengival e de placa, sendo que essa redução foi comparável ao grupo controlo com clorhexidina.

Todavia, é ainda importante referir que o mecanismo pelo qual os ácidos gordos de cadeia média, presentes no óleo de coco (Pehowich, Gomes, & Barnes, 2000), eliminam microrganismos é desconhecido, mas estudos de microscopia eletrónica indicam que se formam poros nas membranas celulares, tanto em *C. albicans* como noutras espécies (Ogbolu et al., 2007; Thormar, Isaacs, Brown, Barshatzky, & Pessolano, 1987).

IV.2 Método de diluição em meio líquido

O método anterior utilizado não foi completamente fiável pois poderia haver a possibilidade de os óleos usados simplesmente não conseguirem difundir-se pelo ágar e, por isso, testou-se um segundo método que nos poderia trazer melhores resultados.

A eficácia (ou não) dos óleos contra *S. mutans*, *Lactobacillus spp* e *S. mitis* foi analisado pela presença de turvação em cada tubo. Primeiro, através de concentrações bacterianas fixas, foram adicionadas as várias amostras nos quais os resultados não variaram muito em relação aos iniciais, apenas neste método o Monofluorofosfato de Sódio + Xilitol apresentou atividade antibacteriana, o que é provado em estudos que usaram formulações semelhantes (Jauhari et al., 2015; Maden et al., 2018; Ximenes et al., 2017).

Depois, na ínfima possibilidade de os óleos poderem ter algum efeito em concentrações microbianas mais baixas, realizaram-se diluições progressivas da suspensão bacteriana inicial de modo a atingirmos concentrações entre 10^8 e 10^1 , sendo que neste último e no conteúdo 10^2 não houve presença de turvação do tubo respetivo, pelo que se repicaram 100 µl de cada para meio apropriado, de modo a verificar a atividade bactericida ou bacteriostática. No entanto, em ambas as placas houve crescimento, o que nos indicou inibição apenas do crescimento destes microrganismos, nunca os eliminando completamente.

IV.3 Considerações finais

De um modo geral, os resultados foram consistentes, independentemente do método. Apesar de haverem alguns estudos sobre o uso destes produtos à base de plantas, a qualidade da evidência limitada é moderada, ainda que mostrem alguns possíveis benefícios na saúde oral (Gbinigie et al., 2016).

É importante referir que, apesar de a maioria dos estudos não se referir acerca de efeitos adversos do *oil pulling*, foram relatados dois casos de pneumonia lipoide exógena em pacientes que habitualmente o praticavam, com óleo de sésamo. O óleo pode ser involuntariamente aspirado durante o bochecho e, se o mesmo estiver rico em microrganismos, pode resultar então numa pneumonia lipoide (Kuroyama et al., 2015).

Por outro lado, dos inúmeros colutórios que estão disponíveis comercialmente como parte de uma rotina diária de higiene oral, sabe-se que muitos deles contêm apenas um efeito máscara e não um efeito terapêutico, resultando na inibição do crescimento bacteriano temporário. Isto porque tanto podem afetar diretamente as bactérias, como neutralizar os compostos químicos produzidos pelas mesmas (Blom, Slot, Quirynen, & Van der Weijden, 2012; Saad, Greenman, & Shaw, 2011).

Existem formulações que apresentam compostos aromatizantes, em casos de halitose por exemplo, que mascaram os efeitos das substâncias que a causam (Saad et al., 2011). Os óleos vegetais, tal como o óleo de sésamo e óleo de coco, têm vindo a ganhar alguma evidência científica, uma vez que têm demonstrado ser um produto inibidor do crescimento de certas bactérias, exibindo um efeito terapêutico. Contudo, neste estudo, provou ter apenas um efeito máscara, pois não teve qualquer impacto direto em *S. mutans*, *Lactobacillus spp.* e *S. mitis*.

IV.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O *oil pulling* é um mecanismo cujos benefícios dependem de vários aspetos e os estudos *in vitro* não reproduzem as condições que se geram aquando o bochecho oral. Este estudo apenas refletiu a possível ação direta das variáveis em estudo.

Outra limitação prende-se com o facto de não se terem estudado todas as marcas comerciais de óleo de coco e óleo de sésamo disponíveis no mercado, pelo que as propriedades individuais poderão diferir consoante a marca.

Além disso, não foi avaliado o número de ufc, após o método de diluição, o que não nos permitiu validar as hipóteses de estudo.

Durante o processo laboratorial, o método de difusão em agar pode não ter sido adequado para haver a difusão dos óleos pelos meios de cultura apropriados, o que pode ser interpretado como uma limitação do estudo, também.

IV.5 PERSPETIVAS FUTURAS

Futuramente, seria interessante avaliar *in vivo* o efeito destes óleos na inibição de bactérias cariogénicas ou até de outras espécies bacterianas, para se verificar se, na verdade, poderá existir alguma aplicação na higiene oral diária ou até na prevenção de outras patologias orais como a doença periodontal.

V. CONCLUSÕES

Após os ensaios efetuados e, perante os resultados obtidos e das limitações deste estudo, foi possível concluir que:

Independentemente da marca comercial selecionadas, os óleos de coco e de sésamo estudados não apresentam capacidade inibitória *in vitro* sobre bactérias cariogénicas, e *S. mitis*.

Alguns autores defendem a capacidade antimicrobiana destes óleos devido ao efeito da saponificação, emulsão e ação de limpeza mecânica, e ainda dos compostos resultantes da reação dos constituintes dos óleos com a saliva, que inibem o desenvolvimento bacteriano. Assim como da camada viscosa que se forma, que impede a adesão de bactérias aos dentes. No entanto, são mecanismos que ocorrem apenas quando é feito um bochecho com os mesmos, sendo por isso um efeito indireto destes óleos vegetais.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Anand, T. D., Pothiraj, C., Gopinath, R. M., & Kayalvizhi, B. (2008). Effect of oil-pulling on dental caries causing bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 2, 63–66.
- Anushree, B., Fawaz, M. A., Narahari, R., Shahela, T., & Syed, A. (2015). Comparison of antimicrobial efficacy of triclosan - Containing, herbal and homeopathy toothpastes-An invitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(10), 5–8.
- Arunakul, M., Thaweboon, B., Thaweboon, S., Asvanund, Y., & Charoenchaikorn, K. (2011). Efficacy of xylitol and fluoride mouthrinses on salivary mutans streptococci. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(6), 488–490. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60106-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60106-8)
- Asokan, S., Emmadi, P., & Chamundeswari, R. (2009). Effect of oil pulling on plaque induced gingivitis: A randomized, controlled, triple-blind study. *Indian Journal of Dental Research*, 20(1), 47–51.
- Asokan, S., Kumar, R., Emmadi, P., Raghuraman, R., & Sivakumar, N. (2011). Effect of oil pulling on halitosis and microorganisms causing halitosis: A randomized controlled pilot trial. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 29(2), 90–94.
- Asokan, S., Rathan, J., Muthu, M. S., Rathna, P. V, Emmadi, P., Raghuraman, & Chamundeswari. (2008). Effect of oil pulling on Streptococcus mutans count in plaque and saliva using Dentocult SM Strip mutans test: a randomized, controlled, triple-blind study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 26(1), 12–17.
- Asokan, S., Rathinasamy, T., Inbamani, N., Menon, T., Kumar, S. S., Emmadi, P., & Raghuraman, R. (2011). Mechanism of oil-pulling therapy -In vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 22(1), 34–37.
- Bekeleski, G. M., McCombs, G., & Melvin, W. L. (2012). Oil Pulling : An Ancient Practice for a Modern Time. *Journal of International Oral Health*, 4(3), 1–10.
- Blom, T., Slot, D., Quirynen, M., & Van der Weijden, G. (2012). The effect of mouthrinses on oral malodor: a systematic review. *International Journal of Dental*

Hygiene, 10(3), 1–14.

Brex, M., Macdonald, L., Legary, K., Cheang, M., & Forgay, M. G. E. (1993). Long-term Effects of Meridol and Chlorhexidine Mouthrinses on Plaque, Gingivitis, Staining and Bacterial Vitality, 72(8), 1194–1197.

Cardoso, C. R., Passos, D., & Raimondi, J. V. (2018). Understanding the dental carie. *SALUSVITA*, 36(4), 1153–1168.

CLSI (Ed.). (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (28th Editi). Wayne, PA.

Cury, J. a. (2001). Uso do flúor e controle da cárie como doença. *Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades*, (2), 33–68.

Dinwiddie, M. T., Terry, P. D., & Chen, J. (2014). Recent Evidence Regarding Triclosan and Cancer Risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(2), 2209–2217.

Fejerskov, O., & Kidd, E. (2008). *Dental Caries: The Disease and its Clinical Management*. United Kingdom: Blackwell Munksgaard Ltd.

Gbinigie, O., Onakpoya, I., Spencer, E., McCall MacBain, M., & Heneghan, C. (2016). Effect of oil pulling in promoting oro dental hygiene: A systematic review of randomized clinical trials. *Complementary Therapies in Medicine*, 26, 47–54.

Gunsolley, J. C. (2006). A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *Journal of the American Dental Association*, 137(12), 1649–1657. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0110>

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, Pathogenesis and Prevention—A Journey to Break the Wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15.

Haffajee, A. D., Yaskell, T., & Socransky, S. S. (2008). Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. *Journal of the American Dental Association*, 139(5), 606–611.

Haresaku, S., Hanioka, T., Tsutsui, A., Yamamoto, M., Chou, T., & Gunjishima, Y. (2007). Long-term effect of xylitol gum use on mutans streptococci in adults. *Caries Research*, 41(3), 198–203.

Hebbbar, A., Keluskar, V., & Shetti, A. (2010). Oil pulling – Unraveling the path to mystic

- cure. *Journal of International Oral Health*, 2(4), 11–14.
- Jauhari, D., Srivastava, N., Rana, V., & Chandna, P. (2015). Comparative Evaluation of the Effects of Fluoride Mouthrinse, Herbal Mouthrinse and Oil Pulling on the Caries Activity and Streptococcus mutans Count using Oratest and Dentocult SM Strip Mutans Kit. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 8(2), 114–118.
- Karygianni, L., Al-ahmad, A., Argyropoulou, A., & Hellwig, E. (2016). Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms, 6, 1–17.
- Kaushik, M., Reddy, P., Roshni, Udameshi, P., Mehra, N., & Marwaha, A. (2016). The effect of coconut oil pulling on Streptococcus mutans count in saliva in comparison with chlorhexidine mouthwash. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(1), 38–41. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1800>
- Kumar, V., & Shanbhag, L. (2017). Oil pulling for maintaining oral hygiene – A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 106–109.
- Kuroyama, M., Kagawa, H., Kitada, S., Maekura, R., Mori, M., & Hirano, H. (2015). Exogenous lipoid pneumonia caused by repeated sesame oil pulling: A report of two cases. *BMC Pulmonary Medicine*, 15(135), 1–5.
- Lakshmi, T., Rajendran, R., & Krishnan, V. (2013). Perspectives of oil pulling therapy in dental practice. *Dental Hypotheses*, 4(4), 131–134.
- Leites, A., Pinto, M., & Sousa, E. (2006). Aspectos microbiológicos da cárie dental. *SALUSVITA*, 25(2), 239–252.
- Lorenz, K., Bruhn, G., Heumann, C., Netuschil, L., Brex, M., & Hoffmann, T. (2006). Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study. *Journal of Clinical Periodontology*, 33, 561–567.
- Maden, E. A., Altun, C., Ozemn, B., & Basak, F. (2018). Antimicrobial Effect of Toothpastes Containing fluoride, xylitol, or xylitol-probiotic on salivary streptococcus mutans and Lactobacillus in Children. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 21(2), 134–138.
- Mäkinen, K. K., Isotupa, K. P., Mäkinen, P. L., Söderling, E., Song, K. B., Nam, S. H.,

- & Jeong, S. H. (2005). Six-month polyol chewing-gum programme in kindergarten-age children: A feasibility study focusing on mutans streptococci and dental plaque. *International Dental Journal*, 55(2), 81–88.
- Mickenausch, S., & Yengopal, V. (2012). Anticariogenic effect of xylitol versus fluoride - A quantitative systematic review of clinical trials. *International Dental Journal*, 62(1), 6–20.
- Milgrom, P., Ly, K. A., Roberts, M. C., Rothen, M., Mueller, G., & Yamaguchi, D. K. (2006). Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum. *Journal of Dental Research*, 85(2), 177–181.
- Ogbolu, D. O., Oni, A. A., Daini, O. A., & Oloko, A. P. (2007). In Vitro Antimicrobial Properties of Coconut Oil on Candida Species in Ibadan, Nigeria. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 384–387.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(2), 301–307.
- Pathak, S. (2016). Oil pulling therapy in dental practice: A short review. *SRM Journal of Research in Dental Sciences*, 7(1), 33–35.
- Peedikayi, F., Remy, V., John, S., Chandru, T., Sreenivasan, P., & Bijapur, G. (2016). Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on Streptococcus mutans: An : An in vivo study study. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 6(5), 447. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.192934>
- Peedikayil, F., Sreenivasan, P., & Narayanan, A. (2015a). Effect of coconut oil in plaque related gingivitis - A preliminary report. *Nigerian Medical Journal*, 56(2), 143. <https://doi.org/10.4103/0300-1652.153406>
- Peedikayil, F., Sreenivasan, P., & Narayanan, A. (2015b). Effect of coconut oil in plaque related gingivitis - A preliminary report. *Nigerian Medical Journal*, 56(2), 143–147.
- Pehowich, D. J., Gomes, A. V., & Barnes, J. A. (2000). Fatty Acid Composition and Possible Health Effects of Coconut Constituents. *West Indian Medical Journal*, 49(2), 128.

- Pickett FA. (2011). Nonfluoride caries preventive agents: new guidelines. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 12(6), 1–56.
- Puri, N. (2015). Holistic Approach of Oil Pulling in the Dental World: A Literature Review. *The Dental Assistant*, 20–23.
- Roopavathi, K. M., Venu Gopal, S., Pushpalatha, G., Bennadi, D., Renushri, B. V., & Madhura, A. S. (2015). Antimicrobial Efficacy of Commercially Available Toothpastes – An In vitro Study. *Journal of Young Pharmacists*, 7(3), 187–193.
- Rossi, A. De, Ferreira, D. C. A., Silva, R. A. B. da, Queiroz, A. M. de, Silva, L. A. B. da, & Nelson-Filho, P. (2014). Antimicrobial Activity of Toothpastes Containing Natural Extracts, Chlorhexidine or Triclosan. *Brazilian Dental Journal*, 25(3), 186–190.
- Saad, S., Greenman, J., & Shaw, H. (2011). Comparative effects of various commercially available mouthrinse formulations on oral malodour. *Oral Diseases*, 17(2), 180–186.
- Sala, E. C., & García, P. B. (2013). *Odontologia preventiva y comunitária: Principios, métodos y aplicaciones* (4th ed.). Barcelona: Elsevier Masson.
- Sharma, A., Agarwal, N., Anand, A., & Jabin, Z. (2018). To compare the effectiveness of different mouthrinses on Streptococcus mutans count in caries active children. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(2), 113–117.
- Sheikh, F., & Iyer, R. (2016). The effect of oil pulling with rice bran oil, sesame oil, and chlorhexidine mouth rinsing on halitosis among pregnant women: A comparative interventional study. *Indian Journal of Dental Research*, 27(5), 508–512.
- Shino, B., Peedikayil, F. C., Jaiprakash, S. R., Bijapur, G., Kottayi, S., & Jose, D. (2016). Comparison of Antimicrobial Activity of Chlorhexidine, Coconut Oil, Probiotics, and Ketoconazole on Candida albicans Isolated in Children with Early Childhood Caries: An in Vitro Study. *Scientifica*, 2016, 1–5.
- Singh, A., & Purohit, B. (2011). Tooth brushing, oil pulling and tissue regeneration: A review of holistic approaches to oral health. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 2(2), 64–68.
- Singh, S., Sharma, P., & Shreehari, A. K. (2015). Dental Plaque Biofilm: An Invisible Terror in the Oral Cavity. *Pakistan Oral & Dental Journal*, 6(1), 422–428.
- Singla, N., Acharya, S., Martena, S., & Singla, R. (2014). Effect of oil gum massage

- therapy on common pathogenic oral microorganisms - A randomized controlled trial. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(4), 441.
- Söderling, E. M. (2009). Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque. *Advances in Dental Research*, 21(1), 74–78. <https://doi.org/10.1177/0895937409335642>
- Sood, P., Devi M, A., Narang, R., V, S., & Makkar, D. K. (2014). Comparative efficacy of oil pulling and chlorhexidine on oral malodor: A randomized controlled trial. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(11), 18–21. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/29167.10065>
- Sooryavanshi, S., & Mardikar, B. R. (1994). Prevention and Treatment of Disease of Mouth by Gandoosh and Kavalu. *Ancient Science of Life*, 13(3–4), 266–270.
- Szafranski, S. P., Winkel, A., & Stiesch, M. (2017). The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms, 250, 29–44.
- Takahashi, K., Fukazawa, M., Motohira, H., Ochiai, K., & Nishikawa, H. (2003). A Pilot Study on Anti plaque Effects of Mastic Chewing Gum in the Oral Cavity, 501–505.
- Thaweboon, S., Nakaparksin, J., & Thaweboon, B. (2013). Effect of oil-pulling on oral microorganisms in biofilm models. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2), 83–89. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4800959a>
- Thormar, H., Isaacs, C. E., Brown, H. R., Barshatzky, M. R., & Pessolano, T. (1987). Inactivation of Enveloped Viruses and Killing of Cells by Fatty Acids and Monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 31(1), 27–31.
- Thurnheer, T., & Belibasakis, G. N. (2017). Effect of sodium fluoride on oral biofilm microbiota and enamel demineralization. *Archives of Microbiology*, 89, 77–83.
- Valen, H., & Scheie, A. (2018). Biofilms and their properties. *European Journal of Oral Sciences*, 126, 13–18.
- Ximenes, M., Cardoso, M., Astorga, F., Arnold, R., Pimenta, L. A., & Viera, R. de S. (2017). Antimicrobial activity of ozone and NaF-chlorhexidine on early childhood caries. *Brazilian Oral Research*, 31(2), 1–10.